Journal of Horticultural Science
Vol. 34, No.3, Fall 2020, P. 405-416
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۴۱۶-۴۰۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

مقاله علمی-پژوهشی

غربالگری اکوتیپ‌های بید علفی پونه‌ای ایران از لحاظ ظرفیت آنتی اکسیدانی

میترا محمدی بازرگانی[1]*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱۰

چکیده

خصوصیات فیتوشیمیایی گیاهان دارویی بستگی به شرایط آب و هوایی منطقه تحت رویش، مرحله رشدی، عوامل ژنتیکی و غیره دارد، لذا مطالعه فلورهای وحشی در مناطقی با شرایط آب و هوایی مختلف مهم می‌باشد. تحقیق حاضر به غربالگری ۱۶ اکوتیپ بیدعلفی پونه‌ای (*Epilobium parviflorum*) ایران از لحاظ ظرفیت آنتی اکسیدانی (AOX) می پردازد. مقدار فنل کل (TPH)، فلاونوئید کل (TFL) و ظرفیت آنتی اکسیدانی به ترتیب با روش‌های فولین- سیکالتو، کلرید آلومینیوم و قدرت احیای فریک (FRAP) اندازه‌گیری شد. تجزیه رگرسیون جهت بررسی رابطه بین ظرفیت آنتی اکسیدانی با ارتفاع و عرض جغرافیایی انجام شد و برای بررسی رابطه خطی بین متغیرها از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. میان اکوتیپ‌های پارویفلروم همبستگی بالایی بین TPH و TFL (r=0.7)، بین AOX با TPH (r=0.71) و AOX با TFL (r=0.73) مشاهده گردید. تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد، دو مولفه اول ۸۷/۸۷ درصد از کل تغییرات را توجیه می‌کنند، سهم مولفه اول ۶۲/۱۳ درصد و مولفه دوم ۲۵/۷۴ درصد بود. در مولفه اول TFL، TPH و AOX به ترتیب با ضرایب ۰/۷۸، ۰/۷۶ و ۰/۸۵ قرار گرفتند. بیشترین مقدار TPH، TFL و AOX مربوط به اکوتیپ چشمه سنگان و کمترین برای اکوتیپ کلیبر مشاهده گردید. ۶ اکوتیپ دارای مقدار مطلوب TFL، TPH و AOX بودند. تجزیه رگرسیون ارتباطی را بین ظرفیت AOX با ارتفاع (R^2=0.04) و نیز با عرض جغرافیایی (R^2=0.14) نشان نداد. نتایج بیانگر وجود تنوع قابل ملاحظه‌ای بین اکوتیپ‌ها برای صفات تحت مطالعه بود که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی و حفاظت ژرم پلاسم بهره‌گیری شود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، ارتفاع، تنوع فیتوشیمیایی، فلاونوئید، فنلیک اسید، عرض جغرافیایی، *E. parviflorum*

مقدمه

گونه *Epilobium parviflorum* (بید علفی پونه‌ای) معروف به (Hoary willowherb)، یک گیاه بوته‌ای چند ساله متعلق به سرده *Epilobium* از تیره گل مغربی (Onagraceae) می‌باشد. این گیاه در سرتاسر اروپا بویژه بریتانیا، از سوئد تا شمال آفریقا و غرب آسیا تا کشمیر، در ایالات متحده و کانادا به صورت وحشی پراکنده می‌باشد. گونه *E. parviflorum* در درمان اختلالات پروستات و کاربرد آن به ویژه برای بیماران مبتلا به هیپرپلازی خوش‌خیم پروستات (BPH) توصیه شده است. گیاه شناس اتریشی ماریا تربن استفاده از گیاهان بیدعلفی را (به خصوص بید علفی پونه‌ای *E. parviflorum*) جهت استفاده در درمان هیپرپلازی خوش‌خیم پروستات، پروستاتیت و همچنین بیماری‌های مثانه و کلیه توصیه می‌کند. توصیه این گیاه‌شناس بر اساس نتایج متعددی از مواردی است که تحت درمان با استفاده از شاخ و برگ گیاهان بیدعلفی رخ داده و موثر بوده است می‌باشد (۱۹). اثبات شده است که عصاره گیاه بیدعلفی دارای ظرفیت آنتی اکسیدان بالا است که به غلظت بالایی از محتوی فلاونوئیدها در آن نسبت داده می‌شود (۱ و ۱۵). در بررسی‌های انجام شده روی ۵ گونه از جنس بیدعلفی (*E. parviflorum* Schreb., *E. roseum* Schreb., *E. tetragonum* L., *E. montanum* L., *E. angustifolium* L)، مشخص شده است که *E. parviflorum* بالاترین ظرفیت آنتی اکسیدانی را در بین گونه‌های تحت مطالعه داشته است (۶). تعیین ترکیبات فعال بیولوژیکی عصاره بیدعلفی هنوز در حال انجام است، اما مطالعات متعددی اهمیت درمانی پلی فنل‌ها را اشاره می‌کند (۸ و ۱۸) و ثابت شده است ترکیبات فنلی ظرفیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی دارند.

در میان داروهای گیاهی گزارش شده، عصاره بیدعلفی بهترین داروی گیاهی شناخته شده نیست اما به طور فزاینده‌ای به عنوان مکمل در درمان BPH کاربرد دارد و استفاده می‌شود. با توجه به بررسی‌های غیررسمی گسترده انجام شده، حداقل سه محصول

۱- استادیار پژوهشی، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: bazargani@irost.ir)
DOI: 10.22067/jhorts4.v34i3.78948

مختلف بیدعلفی (بیشتر به عنوان چای‌های درمانی یا مکمل‌های غذایی) در کشورهای عضو اتحادیه اروپا در دسترس هستند و در ایالات متحده و استرالیا انواع مکمل‌های مبتنی بر گیاه بیدعلفی گسترده تر می‌باشد (۶). بررسی‌ها نشان داده است که ترکیبات با ویژگی آنتی آندروژنیک، آنتی اکسیدان و ضد التهابی در گیاه بیدعلفی ممکن است در درمان بیماران مبتلا به BPH موثر باشد.

جنس بیدعلفی در ایران دارای ۱۸ گونه چند ساله و علفی می‌باشد که عمدتا در مناطق مرکزی و شمالی ایران می‌رویند که گونه بید علفی پونه‌ای (*E. parviflorum*) را نیز شامل می‌شود. جمعیت‌های وحشی این گونه در طیفی از مناطق کوهستانی واقع در شمال، شمال غرب، غرب و مرکز ایران در شرایط مختلف آب و هوایی می‌رویند. امروزه استخراج ترکیبات گیاهی برای اهداف دارویی از رویشگاه‌های طبیعی آن گیاه مرسوم می‌باشد و متاسفانه هنوز روش‌های اهلی نمودن و بهینه‌سازی کشت گیاهان دارویی برای همه گیاهان انجام نشده است و از طرف دیگر محتوای فلانوئید و ترکیبات فنلی گیاه دارویی مورد نظر بسته به شرایط آب و هوایی محل برداشت متغیر است که ظرفیت آنتی اکسیدانی را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد.

با توجه به اینکه گونه بیدعلفی پونه‌ای (*E. parviflorum*) بالاترین ظرفیت آنتی اکسیدانی را در میان گونه‌های جنس بیدعلفی دارد و دارای خواص دارویی مهمی می‌باشد، همچنین ظرفیت آنتی اکسیدانی به دلیل حضور ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در داشتن خواص دارویی گونه مذکور تاثیرگذار است، لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی وضعیت اکوتیپ‌های وحشی بیدعلفی پونه‌ای از لحاظ ظرفیت آنتی اکسیدانی، محتوی فنلی و فلاونوئید کل و ارتباط ارتفاع رویشگاه گیاه با محتوی ترکیبات و ظرفیت آنتی اکسیدانی می‌باشد. براساس مطالعات صورت گرفته مشخص شده است تاکنون تحقیقی روی این گونه در سطح اکوتیپ از جنبه خصوصیات فیتوشیمیایی صورت نگرفته و یا گزارشی منتشر نشده است و مطالعه حاضر اولین گزارش در بررسی‌های فیتوشیمیایی و ظرفیت آنتی اکسیدانی اکوتیپ‌های بیدعلفی پونه‌ای ایران در رویشگاه‌های مختلف و بررسی ارتباط ارتفاع رویشگاه گیاه با ظرفیت آنتی اکسیدانی و خصوصیات فیتوشیمیایی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

آزمایش‌ها روی ۱۶ اکوتیپ بیدعلفی پونه‌ای (*E. parviflorum*) جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های طبیعی ایران در مرحله گلدهی بازه زمانی خرداد تا تیر ماه ۱۳۹۳ انجام پذیرفت (جدول ۱، شکل ۱). تعداد ۲۰ نمونه گیاهی از هر اکوتیپ به صورت تصادفی جمع‌آوری گردید. نمونه هرباریومی گونه مذکور با کد هرباریومی IBRC P1012145 در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران شناسایی و ثبت گردید.

استخراج عصاره گیاهی

اندام هوایی نمونه‌های جمع‌آوری شده بیدعلفی پونه‌ای در دمای اتاق، در سایه و تهویه مناسب خشک شدند. مقدار ۲ گرم از بافت برگ خشک شده، پودر گردید و به مدت ۲۴ ساعت با ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد استخراج گردید. عصاره هر نمونه از طریق یک فیلتر کاغذی با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر و در دور ۳۱۰۰ به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره‌های بدست آمده مایل به سبز روشن تا زمان تجزیه و تحلیل اسپکتروفتومتری در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد نگهداری و ذخیره شدند (۱۳).

اندازه‌گیری محتوی فلاونوئیدهای کل (TFL)

جهت اندازه گیری فلاونوئید کل، از میکروپلیت‌های ۹۶ تایی با حجم ۲۰۰ میکرولیتر برای هر چاهک استفاده گردید. ابتدا در هر چاهک ۲۰ میکرولیتر عصاره خام (تهیه شده در بالا)، ۲۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$)۱۰ درصد، ۲۰ میکرولیتر استات پتاسیم و ۱۴۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اضافه گردید و مخلوط شدند. برای تهیه منحنی استاندارد، ۲۰ میکرولیتر روتین (با غلظت های مختلف از ۱۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به همراه ۲۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$)۱۰ درصد، ۲۰ میکرولیتر استات پتاسیم و ۱۴۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اضافه گردید. غلظت و محتوی کل فلاونوئید با اندازه گیری جذب محلول واکنش در طول موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت الایزا ریدر (lab-system multiskan MS, finland) محاسبه شد. مقدار فلاونوئید کل بر حسب میلی‌گرم روتین در گرم ماده خشک با استفاده از فرمول توضیح داده شده توسط Rohloff و همکاران (۲۰۱۵) محاسبه شد.

اندازه‌گیری محتوی فنل کل (TPH)

اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنلی کل به روش Folin-Ciocalteu تشریح شده توسط Uleberg و همکاران (۲۰۱۲) با کمی تغییرات انجام شد. به این ترتیب که عصاره خام نمونه ابتدا در متانول ۸۰٪ رقیق سازی شد و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای محیط انکوبه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه مذکور به یک میکروپلیت ۹۶ تایی منتقل و میزان جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت الایزا ریدر (lab-system multiskan MS, finland) اندازه‌گیری شد. مقدار فنل کل بر حسب منحنی استاندارد گالیک اسید (معادل گالیک اسید)، بر حسب میلی گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک قرائت و محاسبه گردید(۲۰).

اندازه‌گیری محتوی آنتی اکسیدان (AOX)

محتوی آنتی اکسیدانی به روش قدرت احیای فریک (FRAP) توصیف شده توسط Uleberg و همکاران (۲۰۱۲) با کمی تغییرات انجام شد. عصاره خام نمونه‌ها ابتدا در متانول ۸۰ درصد رقیق‌سازی شد و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای محیط انکوبه گردید. ۵ میکرولیتر از نمونه به همراه ۱۵۰ میکرولیتر معرف FRAP به هر چاهک میکروپلیت ۹۶ تایی منتقل و به مدت ۴ دقیقه روی شیکر قرار داده شدند. میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت الایزا ریدر (lab-system multiskan MS, finland) اندازه‌گیری و قرائت شد و محتوی آنتی اکسیدانی بر حسب میلی‌مول یون فریک احیا شده (Fe^{+2}) در هر گرم وزن ماده خشک محاسبه گردید(۲۰) .

جدول ۱- اطلاعات جغرافیایی اکوتیپ‌های مختلف بیدعلفی پونه‌ای (*E. parviflorum*) جمع‌آوری شده از رویشگاه های طبیعی ایران

Table 1- The geographic information of *E. parviflorum* ecotypes collected from natural habitats of IRAN

شناسه نمونه Sample ID	استان Province	ارتفاعات Mountains	محل جمع‌آوری Locality	ارتفاع Alt. (m asl)	عرض جغرافیایی Latitude (E)	طول جغرافیایی Longitude (N)
EPP1	گلستان (Golestan)	البرز (Alborz)	علی آباد-شیرین آباد (Ali abad-shirin abad)	641	36.81	55.03
EPP2	گیلان (Gilan)	البرز (Alborz)	چهارمحل(chaharmahal)	1118	36.78	49.73
EPP3	اردبیل (Ardabil)	تلاقی البرز و زاگرس (alborz and zagros intersection)	حیران-تله کابین (Heyran-tele kabin)	1245	38.41	48.58
EPP4	گیلان (Gilan)	البرز (Alborz)	داماش (Damash)	1436	36.78	49.81
EPP5	آذربایجان غربی (West Azerbaijan)	تلاقی البرز و زاگرس (alborz and zagros intersection)	کلیبر-قلعه بابک (Kaleybar-ghale babak)	1471	38.85	47.01
EPP6	اردبیل (Ardabil)	تلاقی البرز و زاگرس (alborz and zagros intersection)	حیران-قبل تونل (Heyran-befor tonnel)	1510	38.45	48.57
EPP8	مازندران (Mazandaran)	البرز (Alborz)	کلاردشت-رودبارک (Kelardasht-rodbarak)	1625	36.46	51.08
EPP9	آذربایجان غربی (West Azerbaijan)	تلاقی البرز و زاگرس (alborz and zagros intersection)	چشمه عین روم (Ayneroom spring)	1719	37.18	45.13
EPP10	اصفهان (Isfahan)	زاگرس (Zagros)	چشمه سنگان (Sangan springs)	1722	31.26	51.28
EPP11	لرستان (Lorestan)	زاگرس (Zagros)	الشتر-کهنام (Alashtar-Kahnam)	1760	33.94	48.28
EPP12	قزوین (Ghazvin)	البرز (Alborz)	الموت-اوان (Alamout-Avan)	1857	36.50	50.45
EPP13	لرستان (Lorestan)	زاگرس (Zagros)	عزیز آباد (Aziz abad)	2051	33.31	49.46
EPP14	آذربایجان غربی (West Azerbaijan)	تلاقی البرز و زاگرس (alborz and zagros intersection)	منبر-شاهین دژ (Manbar-shahin dej)	2114	36.62	46.77
EPP15	قزوین (Ghazvin)	البرز (Alborz)	الموت.۱ (Alamout.1)	2163	36.40	50.22
EPP16	زنجان (Zanjan)	البرز (Alborz)	خان چای طارم (Khan chi-Tarom)	2259	36.70	48.75
EPP17	اردبیل (Ardabil)	تلاقی البرز و زاگرس (alborz and zagros intersection)	شابیل (Shabil)	2670	38.33	47.84



شکل ۱- ساختار کامل گیاه *Epilobium parviflorum* (A)، اکوتیپ گیاهی EPP16 (B)، گل کامل بازشده با مادگی نمایان (C) (عکس از نویسنده مقاله)

Figure 1- Complete structure of *Epilobium parviflorum* (A) Plant ecotype of EPP16 (B), An opened flower with showy pistil (C) (photo by the author)

اندازه‌گیری محتوی آنتوسیانین (ACY)

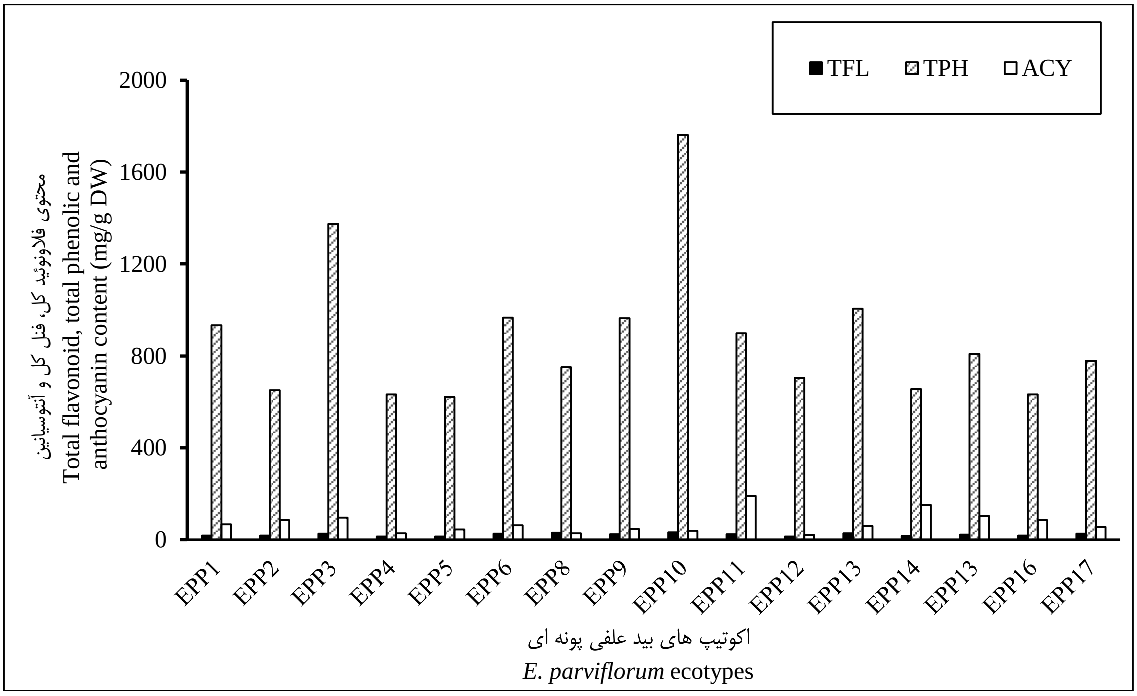
محتوی آنتوسیانین با استفاده از روش pH افتراقی شرح داده شده توسط Uleberg و همکاران (۲۰۱۲) با کمی تغییرات انجام شد. بافرهای مورد استفاده با pH برابر ۱ (۰/۰۲۵ مولار) و pH برابر ۴/۵ (۴/ مولار) به ترتیب بر پایه کلرید پتاسیم (KCl) و سدیم استات ($C_2H_3NaO_2$) بودند. pH بافرها با کلرید هیدروژن (HCL) تنظیم گردید. عصاره خام نمونه‌ها در محلول بافر در زمان اندازه‌گیری رقیق شد و میزان جذب با اسپکتروفتومتر در طول موج نوری ۵۱۰ تا ۷۰۰ نانومتر نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت الایزا ریدر (lab-system multiskan MS, finland) اندازه‌گیری و قرائت شد. میزان و محتوی آنتوسانین بر حسب میلی‌گرم سیانیدین- ۳-گلوکوزید در گرم وزن ماده خشک محاسبه گردید. (۲۰).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تعیین آمار توصیفی از نرم‌افزار XLSTAT 2007.6 استفاده شد و ضریب همبستگی پیرسون، تجزیه به مولفه‌های اصلی انجام پذیرفت، همچنین برای بررسی رابطه بین ظرفیت آنتی اکسیدانی با ارتفاع از سطح دریا و عرض جغرافیایی، تجزیه رگرسیون انجام شد و مقدار ضریب تبیین (R^2) گزارش گردید.

نتایج و بحث

۱۶ اکوتیپ بیدعلفی پونه‌ای (*E. parviflorum*) جمع‌آوری شده از ۱۶رویشگاه طبیعی در ایران (جدول ۱) با استفاده از آنالیزهای فتومتریک جهت اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی، محتوی فنل کل و فلاونوئید کل مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. محتوی فلاونوئید کل (TFL) در ۱۶ اکوتیپ آنالیز شده در دامنه‌ای بین mg/g DW ۱۳/۸۹ برای اکوتیپ EPP5 (کلیبر-قلعه بابک) از توابع آذربایجان شرقی با ارتفاع ۱۴۷۱ متر بالاتر از سطح دریا تا mg/g DW ۳۲/۶۴ برای اکوتیپ EPP10 (چشمه سنگان) از توابع اصفهان در ارتفاع ۱۷۲۲ متر بالاتر از سطح دریا ثبت گردید (شکل ۲). Tóth Hevesi (۲۰۰۹) در بررسی‌های فیتوشیمیایی روی ۵ گونه متفاوت (*E. parviflorum* Schreb., *E. roseum* Schreb., *E. tetragonum* L., *E. montanum* L., *E. angustifolium* L) در هانگاری میزان محتوی فلاونوئید کل را در دامنه‌ای بین mg/g (۸/۳-۶/۹ DW) گزارش نمود و بالاترین میزان TFL در بین ۵ گونه تحت مطالعه برای گونه *E. parviflorum* ثبت گردید (۵). لذا نتایج این تحقیق در مقایسه با تحقیق اخیر قابل توجه است و بالا بودن میزان TFL را در اکوتیپ های بیدعلفی پونه‌ای (*E. parviflorum*) ایران را در مقایسه با گونه مذکور در تحقیق اخیر نشان می‌دهد، بویژه در خصوص اکوتیپ EPP10 (چشمه سنگان) که دارای محتوی بسیار بالای TFL (حدود ۴ برابر مشاهده شده در نمونه بیدعلفی پونه‌ای (در هانگاری)) می‌باشد. همچنین مقادیر TFL در اکوتیپ‌های بیدعلفی پونه‌ای ایران در مقایسه با مقادیر مشاهده شده در اکوتیپ‌های وحشی گونه *E. angustifolium* در اتریش که در دامنه‌ای بین mg/g DW ۱۰/۷-۱۷/۳ گزارش شده است (۱۲)، نیز قابل ملاحظه می‌باشد.



شکل ۲- محتوی فلاوئوئید کل (TFL)، محتوی فنل کل (TPH) و محتوی آنتوسیانین (ACY) در اکوتیپ های *E. parviflorum* (EPP)

Figure 2- Total flavonoid content (TFL), Total phenolic content (TPH) and Anthocyanin content (ACY) in ecotypes (n=16) of *E. parviflorum* (EPP)

میزان ترکیبات فنلی کل (TPH) در اکوتیپ های بید علفی‌پونه‌ای در حدود ۴۴ تا ۵۳ برابر مقدار (TFL) بود و در دامنه‌ای بین mg/g DW ۶۲۱/۶۴ برای اکوتیپ EPP5 (کلیبر-قلعه بابک) از توابع آذربایجان شرقی با ارتفاع ۱۴۷۱ متر بالاتر از سطح دریا تا mg/g DW ۱۷۶۱ برای اکوتیپ EPP10 (چشمه سنگان) در ارتفاع ۱۷۲۲ متر بالاتر از سطح دریا ثبت گردید (شکل ۱). در تحقیق انجام شده روی ۵ گونه مختلف (*E. parviflorum* Schreb., *E. roseum* Schreb., *E. tetragonum* L., *E. montanum* L., *E. angustifolium* L) در هانگاری مقدار TPH در دامنه‌ای بین mg/g DW ۳۴۸-۲۲۳ گزارش گردید که در این میان، گونه بید علفی‌پونه‌ای نسبت به سایر گونه ها بیشترین محتوی TPH (mg/g DW ۳۴۸) (حدود ۴۲ برابر مقدار TFL) دارا بود (۵) که همسو با نتایج مقادیر (TPH) در اکوتیپ های بید علفی‌پونه ای ایران می باشد که در حدود ۴۴ تا ۵۳ برابر مقدار (TFL) می‌باشد. میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در بافت‌های گیاهی جدای از عوامل ژنتیکی یا سن گیاه تحت تاثیر بسیاری از عوامل بیرونی مانند پارامترهای محیطی، زمان برداشت، آلودگی با میکروارگانیسم‌ها و آسیب‌های ناشی از آفات مختلف دارد (۳، ۹ و ۱۴)، در این راستا تحقیقات متعددی نشان داده اند که تابش خورشیدی افزایش یافته، اشعه ماوراء بنفش با تجمع بالای فلاونوئیدهای آنتی اکسیدانی در ارتباط است (۷، ۱۰ و ۱۷)، لذا هم عوامل ژنتیکی، عوامل محیطی می‌تواند بر روی بالا بودن ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در اکوتیپ‌های بید علفی‌پونه‌ای (*E. parviflorum*) ایران به ویژه اکوتیپ EPP10 (چشمه سنگان) در مقایسه با نمونه هانگاری تاثیرگذار باشد که نیاز به مطالعات بیشتری دارد. گیاهان این سرده منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه، به خصوص پلی فنل‌ها می‌باشند که خود مجموعه‌ای از فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی و تانن‌ها می‌باشند که این موضوع مقدار چندین برابری TPH نسبت به TFL در اکوتیپ‌های بید علفی‌پونه‌ای ایران را توجیه می‌کند (۴). براساس تحقیقات انجام شده مقدار بسیار بالای TPH نسبت به TFL می تواند دال بر وجود مقادیر تانن بالا در اکوتیپ‌های بید علفی‌پونه‌ای ایران باشد (۵) که نیاز به بررسی و تخمین آن دارد. همچنین مقادیر TPH در اکوتیپ‌های بید علفی‌پونه‌ای ایران به خصوص برای اکوتیپ EPP10 (چشمه سنگان) در مقایسه با نمونه بید علفی‌پونه‌ای هانگاری (۵) بسیار قابل ملاحظه می‌باشد. مقدار TPH در بررسی ۱۰جمعیت از گونه *E. angustifolium* فنلاند، که یکی از گونه‌های دارویی مهم سرده بید علفی می‌باشد مابین mg/g DW ۲۰۰-۱۵۰ گزارش گردید (۲) که این نتیجه بر معرفی اکوتیپ‌های *E. parviflorum* ایران به عنوان منبع غنی از ترکیبات فنلی تایید می‌کند و بر اهمیت آن در مصارف دارویی می‌افزاید. تجزیه و تحلیل همبستگی پیرسون، همبستگی بالایی بین محتوای فنل کل و فلاونوئید کل نشان داد (r=0.7, *P*=0.002, n=16) (جدول ۲).

جدول ۲- ضریب همبستگی بین محتوی ترکیبات فیتوشیمیایی در اکوتیپ های بید علفی‌پونه ای (*E. parviflorum*) (n=16)، محتوی فلاوئوئید کل (TFL)، محتوی فنل کل (TPH)، ظرفیت آنتی اکسیدانی (AOX) و محتوی آنتوسیانین (ACY)،

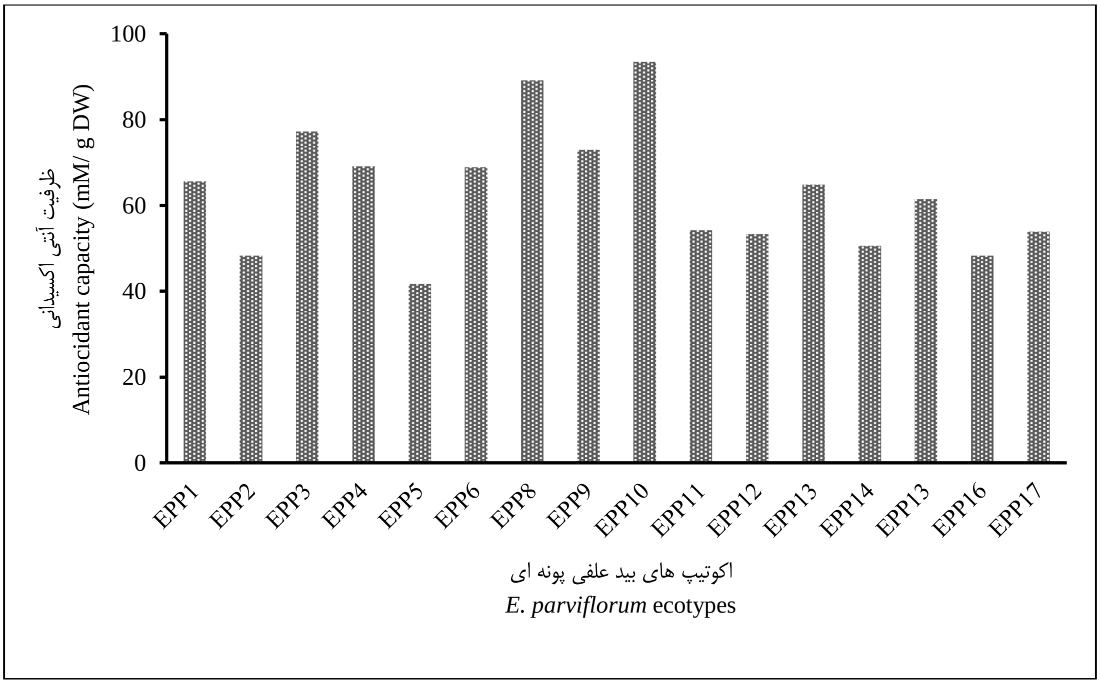
Table 2- The correlation coefficient between the content of phytochemicals in *Epilobium parviflorum* ecotypes (n=16), Total flavonoid content (TFL), Total phenolic content (TPH), Antioxidant capacity (AOX) and Anthocyanin content (ACY)

متغیرها Variables	فلاوئوئید کل (TFL)	فنل کل (TPH)	آنتوسیانین (ACY)	آنتی اکسیدان (AOX)
(TFL) فلاوئوئید کل	**1**	***0.705**	-0.051	**0.733**
(TPH) فنل کل	**0.705**	**1**	-0.057	**0.713**
(ACY) آنتوسانین	-0.051	-0.057	**1**	-0.362
(AOX) آنتی اکسیدان	**0.733**	**0.713**	-0.362	**1**

* مقادیر مشخص شده تفاوت معنی داری با صفر در سطح (α= 0.05) دارند.

*Values in bold are different from 0 with a significance level alpha=0.05

نتایج بررسی محتوی آنتی اکسیدان (AOX) در بین اکوتیپ‌های بید علفی‌پونه‌ای، مقدار AOX را بین حداقل ۴۱/۷۳ mM/g DW برای اکوتیپ EPP5 (کلیبر-قلعه بابک) از توابع آذربایجان شرقی با ارتفاع ۱۴۷۱ متر بالاتر از سطح دریا و حداکثر ۹۳/۵۰ mM/g DW برای اکوتیپ EPP10 (چشمه سنگان) در ارتفاع ۱۷۲۲ متر بالاتر از سطح دریا نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳- ظرفیت آنتی اکسیدانی (AOX) دراکوتیپ های *E. parviflorum* (EPP)

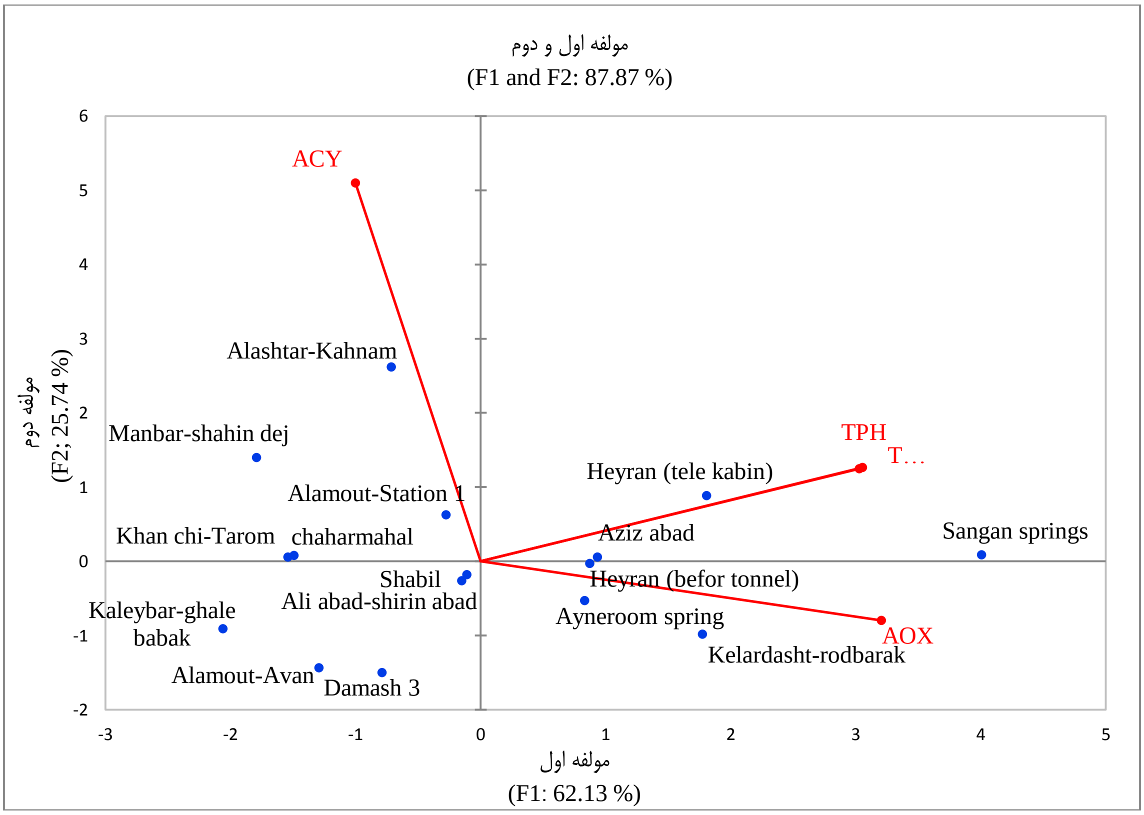
Figure 3- Antioxidant capacity (AOX) in ecotypes (n=16) of *E. parviflorum* (EPP)

یافته‌ها نشان داد که بین محتوی AOX با TPH (r=0.71, *P*=0.002, n=16) و نیز بین AOX با TFL (r=0.73, *P*=0.001, n=16) ارتباط و همبستگی مثبت و معنی‌داری برقرار است (جدول ۲). بالاترین محتوی فنلی کل، فلاونوئید کل و آنتی اکسیدان برای اکوتیپ EPP10 (چشمه سنگان) مشاهده گردید (شکل ۲ و ۳). در نتایج بررسی‌های مختلف نیز ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی به غلظت بالایی از فلاونوئیدها و فنل‌ها نسبت داده شده است (۱، ۶، ۱۵ و ۲۱) که همسو با نتایج مشاهده در این تحقیق می‌باشد.

مقدار آنتوسیانین (ACY) در اکوتیپ‌های بید علفی‌پونه‌ای بین حداقل ۲۱/۱۵ mg/g DW برای اکوتیپ EPP12 (الموت-اوان) با ارتفاع ۱۸۵۷ متر بالاتر از سطح دریا و حداکثر ۱۹۰/۹۲ mg/g DW برای اکوتیپ EPP11 (الشتر-کهنام) با ارتفاع ۱۷۶۰ متر بالاتر از

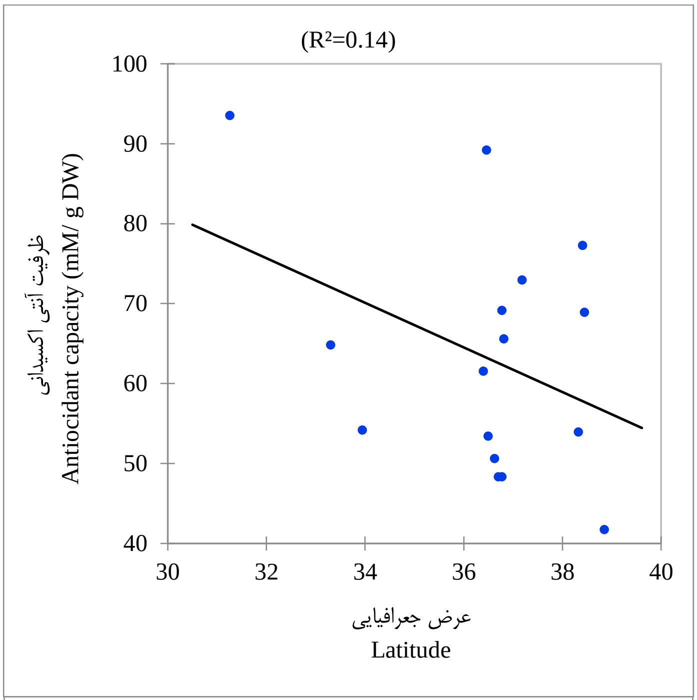
سطح دریا متغیر بود (شکل ۲) و همبستگی منفی ضعیفی بـین ACY با AOX TFL و TPH مشـاهده گردیـد (جـدول ۲). آنتوسـیانین‌هـا (ACY) پلی فنل‌هایی با فعالیت آنتی اکسیدانی شناخته شـده هسـتند که ممکن است مسئول برخی از فعالیت‌های بیولوژیک باشند (۱۱). در مطالعه‌ای روی زغـال اختـه همبسـتگی نسـبی بـین میـزان TPH و AOX گزارش شده، در حالی‌کـه رابطـه بـین ACY و AOX بسـیار ضعیف بوده است و به دنبال ایـن نتیجـه مشـاهده شـده، بـر اهمیـت ترکیبات فنولی غیر از آنتوسیانین ها و سهم آنها در فعالیت کلـی آنتـی اکسیدانی تاکید نمودند (۱۳) که در تایید نتیجه تحقیق حاضر می‌باشد و نشان می‌دهد سهم TPH درظرفیت آنتی اکسیدانی بیشتر از ACY می‌باشد. همچنین از آنجایی که ترکیبات فنولی جـزء ترکیبـات آنتـی اکسیدان می‌باشند بنابراین انتظار مـی‌رود کـه افـزایش میـزان فنـول رابطه مستقیم با افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی داشته باشد کـه ایـن امر در مطالعات انجام شده روی گیاهان این جنس مشاهده شده است (۱، ۶، ۱۶ و ۲۱) و تایید نتایج مشاهده شده در تحقیق حاضر می‌باشد.

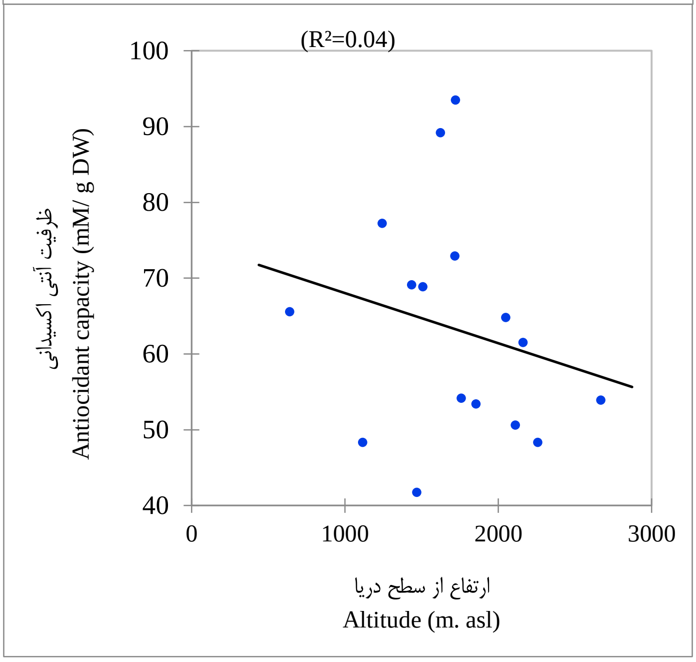
نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی ۴ صفت فیتوشـیمیایی مطالعه شده نشان داد که دو مولفه اول ۸۷/۸۷ درصد از کل واریـانس را توجیه کردند که سهم مولفه اول به تنهایی ۶۲/۱۳ درصـد و سـهم مولفه دوم ۲۵/۷۴ درصد بود. در مولفه اول TFL، TPH و AOX به ترتیب با ضریب ۰/۷۷۹، ۰/۷۶۵ و ۰/۸۵۸ قرار گرفتنـد. مولفـه دوم را ACY با ضریب ۰/۸۹۸تشکیل داد (شکل ۴). سهم بـالا از دو عنصـر اول، ارتباط معنی‌داری بین ۴ صفت فیتوشیمیایی داشت. اکوتیپ‌هـای *E. parviflorum* به وضوح براساس مولفه اول اصلی جدا شـدند. ۱۰ اکوتیپ شامل اکوتیپ های چهار محل، تله کابین حیران، کلیبر، تونل حیران، کلاردشت، چشمه عین روم، چشمه سنگان، عزیز آبـاد، منبـر، خان چای یک همبستگی با مولفه اصلی اول (PC1) نشان داده شـده توسط TFL، TPH و AOX داشتند که از این میان، ۶ اکوتیـپ تلـه کابین حیـران، تونـل حیـران، کلاردشـت، چشـمه عـین روم، چشـمه سنگان، عزیـز آبـاد دارای همبسـتگی مثبـت (r> 0.6) و ۴ اکوتیـپ چهارمحل، کلیبر، منبر و خان چای داری همبستگی منفـی (r> 0.6) با مولفه اصلی اول (PC1) داشتند.



شکل ٤- پلات دو بعدی با استفاده از تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی نشان دهنده تنوع در میان اکوتیپ‌های بیدعلفی پونه‌ای (*E. parviflorum*)، محتوی فلاوئوئید کل (TFL)، محتوی فنل کل (TPH)، محتوی آنتوسیانین (ACY) و ظرفیت آنتی اکسیدانی (AOX)

Figure 4- The two-dimensional plot obtained by principle component analysis illustrating the variation among *E. parviflorum* ecotypes, Total flavonoid content (TFL), Total phenolic content (TPH), Anthocyanin content (ACY) and Antioxidant capacity (AOX)





شکل ۵- نمودار حاصل از تجزیه رگرسیون ارتباط بین ظرفیت آنتی اکسیدان (AOX) اکوتیپ های بیدعلفی پونه ای (*E. parviflorum*) با عرض جغرافیایی (A) و ارتفاع از سطح دریا (B)

Figure 5- The regression analysis of relationship between antioxidant capacities of the *E. parviflorum* ecotypes with latitude (A) and altitudes above sea level (B)

تنها ۴ اکوتیپ شامل داماش، الشتر، الموت (اوان)، الموت همبستگی ($r > 0.5$) با مولفه اصلی دوم (PC2) نشان داده شده توسط ACY داشتند که از این میان الشتر و الموت دارای همبستگی مثبت و داماش و الموت (اوان) همبستگی منفی داشتند. بدین ترتیب

از میان ۱۶ اکوتیپ بیدعلفی پونه ای (*E. parviflorum*) ایران، ۶ اکوتیپ تله کابین حیران، تونل حیران، کلاردشت، چشمه عین روم، چشمه سنگان، عزیز آباد از محتوی ترکیبات TFL، TPH و متعاقبا ظرفیت آنتی اکسیدانی مطلوب برخوردار می‌باشند، که اکثر۶ اکوتیپ

متعلق به ارتفاعات زاگرس و تلاقی البرز و زاگرس مـی‌باشـند و فقـط یک اکوتیپ مربوط به ارتفاعات البرز می‌باشد و اکوتیـپ‌هـایی کـه از محتـوی مطلـوب TFL، TPH و AOX برخـوردار نمـی‌باشـند همبستگی منفی با مولفه اصلی اول (PC1) دارند و نیز اکوتیـپ‌هـایی که هیچ همبستگی با مولفه اصلی اول (PC1) ندارند اکثرا متعلـق بـه ارتفاعات البرز می‌باشند.

تجزیه و تحلیل رگرسیون روی داده‌هـای محتـوی AOX انجـام شد و هـیچ ارتبـاطی بـین ظرفیـت AOX بـا ارتفـاع از سـطح دریـا (R^2=0.04) و نیز با عرض جغرافیـایی(R^2=0.14) مشـاهده نگردیـد (شکل ۵). به عبارتی ظرفیت AOX در اکوتیـپ‌هـای تحـت مطالعـه متاثر از ارتفاع از سطح دریا و عرض جغرافیایی نمی‌باشد.

نتیجه‌گیری

این تحقیق اولین مطالعه‌ای است که ظرفیت AOX را با استفاده از اکوتیـپ‌هـای چندگانـه (n = 16) گونـه *E. parviflorum* بـرای ارزیابی تغییرات فیتوشیمیایی درون گروهی *E. parviflorum* نشـان می‌دهد. نتایج تحقیق نشان داد که بین TFL، TPH و AOX ارتباط مثبت معنی‌داری وجـود دارد. هـیچ ارتبـاط معنـی‌داری بـین محتـوی TFL، TPH و ظرفیت AOX با ارتفاع بالاتر از سطح دریا برای *E. parviflorum* یافـت نشـد. نتـایج نشـان داد کـه اکوتیـپ‌هـای *E. parviflorum* ایران (به ویژه اکوتیپ سـنگان EPP10) دارای مقـدار TFL، TPH و ظرفیت AOX بالا و مطلوبی نسبت به گـزارش‌هـای قبلی ارایه شـده در گونـه مـذکور هسـتند. اکثـر اکوتیـپ‌هـای دارای محتـوی قابـل ملاحظـه TFL، TPH و ظرفیـت AOX متعلـق بـه ارتفاعات زاگرس و تلاقی البرز و زاگرس می‌باشند نتایج ایـن مطالعـه نشان می‌دهد که در بین اکوتیپ های *E. parviflorum* ایران بـرای صفات مورد مطالعه تنوع قابل ملاحظه‌ای وجود دارد که می‌تواند برای اجرای برنامه‌های اصـلاحی و حفاظـت ژرم پلاسـم مـورد اسـتفاده و بهره‌برداری قرار گیرد.

سپاسگزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فن‌آوران کشور (شماره طـرح ۹۲۰۳۴۸۳۳) به خاطر حمایت مالی جهت انجام بخشی از این پژوهش تشکر می گردد. از دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه علـوم و تکنولـوژی نروژ جهت فراهم آوردن تجهیزات انجام بخشی از اجرای طرح تشـکر می‌گردد.

منابع

1- Arredondo M., Blasina F., Echeverry C., Morquio A., Ferreira M., and et al. 2004. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) DC and some of its main flavonoids against oxidative stress. Journal of Ethnopharmacology 91: 13-20.

2- Baert N., Kim J., Karonen M., and Salminen J.P. 2017. Inter-population and inter-organ distribution of the main polyphenolic compounds of *Epilobium angustifolium*. Phytochemistry 134: 54-63.

3- Blumthaler M., Ambach W., and Ellinger R. 1997. Increase in solar UV radiation with altitude. Journal of photochemistry and Photobiology B: Biology 39: 130-134.

4- Granica S., Piwowarski J.P., Czerwińska M.E., and Kiss A.K. 2014. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): a review. Journal of Ethnopharmacology 156: 316-346.

5- Hevesi Tóth B. 2009. Phytochemical and in vitro biological evaluation of potentially active compounds in *Epilobium* species. Thesis of doctoral (Ph. D.) dissertation. Semmelweis University, Budapest.

6- Hevesi Tóth B., Blazics B., and Kéry Á. 2009. Polyphenol composition and antioxidant capacity of *Epilobium* species. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 49: 26-31.

7- Jaakola L., Määttä-Riihinen K., Kärenlampi S., and Hohtola A. 2004. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. Planta 218: 721-728.

8- Kiss A., Kowalski J., and Melzig M.F. 2004. Compounds from *Epilobium angustifolium* inhibit the specific metallopeptidases ACE, NEP and APN. Planta Medica 70: 919-923.

9- Körner C. 2003 .Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems; with 47 tables. Springer Science & Business Media.

10- Markham K.R., Ryan K.G., Bloor S.J., and Mitchell K.A. 1998. An increase in the luteolin: apigenin ratio in Marchantia polymorpha on UV-B enhancement. Phytochemistry 48: 791-794.

11- Miguel M.G. 2011. Anthocyanins: antioxidant and/or anti-inflammatory activities. Journal of applied pharmaceutical Science 1: 7-15.

12- Monschein M., Jaindl K., Buzimkić S., and Bucar F. 2015. Content of phenolic compounds in wild populations of *Epilobium angustifolium* growing at different altitudes. Pharmaceutical Biology 53: 1576-1582.

13- Rohloff J., Uleberg E., Nes A., Krogstad T., Nestby R., and Martinussen I. 2015. Nutritional composition of bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) from forest fields in Norway–Effects of geographic origin, climate, fertilization and soil properties. Journal of Applied Botany and Food Quality 88: 274-289.

14- Seigler D.S. 2012. Plant secondary metabolism. Springer Science & Business Media.

15- Shikov A.N., Poltanov E.A., Dorman H.D., Makarov V.G., Tikhonov V.P., and Hiltunen R. 2006. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of commercial water-soluble willow herb (*Epilobium*

angustifolium L.) extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 3617-3624.

16- Shikov A.N., Poltanov E.A., Dorman H.J.D., Makarov V.G., Tikhonov V.P., and Hiltunen R. 2006. Chemical Composition and in Vitro Antioxidant Evaluation of Commercial Water-Soluble Willow Herb (*Epilobium angustifolium* L.) Extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 3617-3624.

17- Spitaler R., Schlorhaufer P.D., Ellmerer E.P., Merfort I., Bortenschlager S., et al. 2006. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. Phytochemistry 67: 409-417.

18- Steenkamp V., Gouws M., Gulumian M., Elgorashi E., and Van Staden J. 2006. Studies on antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatitis. Journal of Ethnopharmacology 103: 71-75.

19- Treben M. 1984. Health through God's pharmacy, advice and experiences with medicinal herbs. Wilhelm Ennsthaler, Steyr, Austria.

20- Uleberg E., Rohloff J., Jaakola L., Trôst K., Junttila O., et al. 2012. Effects of temperature and photoperiod on yield and chemical composition of northern and southern clones of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 60: 10406-10414.

21- Wojdyło A., Oszmiański J., and Czemerys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry 105: 940-949.

Journal of Horticultural Science
Vol. 34, No.3, Fall 2020, P. 405-416
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۴۱۶-۴۰۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Screening of Antioxidant Capacity of *Epilobium parviflorum* Ecotypes Grown in Iran

M. Mohammadi Bazargani[1*]
Received: 09-04-2019
Accepted: 30-06-2020

Introduction: The phytochemical and biological properties of medicinal plants depend on the climatic conditions of the area under development, the growth stage, genetic factors and other factors. Therefore the study of the wild flora in the geographical areas with different climatic conditions is important. It has been proved that the extract of *Epilobium* has high antioxidant capacity, which is associated with a high concentration of flavonoids content. Studies on five species of *Epilobium* genus (*E. parviflorum* schreb., *E. roseum* schreb., *E. tetragonum* L., *E. montanum* L., *E. angustifolium* L.), had shown that *E. parviflorum* had the highest antioxidant capacity among studied species. The occurrence of *E. parviflorum* in wide range of altitudinal zones in Iran makes it as ideal species to study the variation of antioxidant capacity among ecotypes. The present study aims to screen *Epilobium parviflorum* ecotypes (n=16) of Iran in terms of antioxidant capacity (AOX).

Materials and Methods: Total phenol content (TPH), Total flavonoid (TFL), antioxidant capacity (AOX) and anthocyanin content (ACY) were measured by Folin- Ciocalteu, flavonoid-aluminum chloride (AlCl3), Ferric reducing antioxidant power (FRAP) and the differential PH methods, respectively. Regression analysis was used for studying the relationships between antioxidant capacity, altitude and latitude. The Pearson correlation coefficient was used to determine whether there is a linear relationship between variables.

Results and Discussion: There was a high correlation between total phenol content and total flavonoid in ecotypes (r = 0.7, P = 0.002, n = 16). There was a positive and significant correlation between AOX content with TPH (r = 0.71, P = 0.002, n = 16) and also between AOX with TFL (r = 0.73, P = 0.001, n = 16). According to several studies, high antioxidant capacity has been attributed to high concentrations of flavonoids and phenols, which is consistent with the results observed in this study. The results also showed that the Iranian *E. parviflorum* ecotypes had considerably TFL, TPH and AOX content as compare to previous reports on *E. parviflorum* (in other country) and also other *Epilobium* species. Principal component analysis showed that the two main components explained 87.87% total variation. The high contribution of the two first components suggested a considerable correlation between three phytochemical traits, the contribution of the first component alone was 62.13% and the portion of the second component was 25.74%. In the first component, TFL, TPH and AOX were with coefficients of 0.78, 0.77 and 0.88, respectively. The high contribution of the two first components had a significant relationship between three phytochemical traits. The ecotypes of *E. parviflorum* were clearly separated based on the first principal component. Ten ecotypes had a correlation with the first main component (PC1) shown by TFL, TPH and AOX. Among them six ecotypes had a positive correlation (r> 0.6) and 4 ecotypes had a negative correlation (r> 0.6) with the first main component (PC1). Thus, out of the 16 ecotypes of *E. parviflorum* in Iran, six ecotypes including EPP3, EPP6, EPP8, EPP10, EPP13 and EPP9 had the desired content of TFL, TPH and subsequently antioxidant capacity, most of which belonged to the Zagros and crossroad of Zagros and Alborz mountains. The ecotypes that did not have the desired content of TFL, TPH and AOX (negative correlation with the first main component, PC1) mostly belong to the Alborz Mountains. The highest levels of TPH, TFL and AOX capacity were observed for the Sangan ecotype with values of 1761, 32.64 mg/g DW and 93.50 mM/g DW, respectively, and the lowest was observed in Kaleybar ecotype. Out of 16 ecotypes, 6 ecotypes had the desired content of TFL, TPH, and subsequently AOX, most of which belonged to the Zagros and crossroad of Zagros and Alborz Mountains. Regression analysis showed no relation between AOX capacity with altitude (R^2 = 0.04) and also with latitude (R^2 = 0.14).

Conclusion: This research is the first study that screens AOX capacity by including multiple ecotypes (n=16) from *E. parviflorum* species to evaluate intra ecotypes phytochemical variation for *E. parviflorum*. We found positive and significant correlation between TFL, TPH and AOX. We did not find any significant correlation between TFL, TPH content and AOX capacity of *E. parviflorum* with altitude above sea. Our results also

1- Assistant Professor, Agriculture Institute, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
(*- Corresponding Author Email: bazargani@irost.ir)

showed Iranian *E. parviflorum* ecotypes (especially Sangan ecotype, EPP10) have considerably TFL, TPH and AOX capacity compared to previous reports. The results of this study indicate that there is a remarkable variation among Iranian *E. parviflorum* ecotypes for the studied traits, which can be used to carry out breeding programs and protection of germplasm.

Keywords: Altitude, Antioxidant, *E. parviflorum*, Flavonoid, Latitude, Phenolic acid, Phytochemical variation